

KR Unexamined Patent Publication(A)

Bibliographic Data

IPC	C12Q 1/68
Application No	10-2001-0021753
Application Date	2001-04-23
Open patent No	KR2002-0082022.
Open patent Date	2002-10-30
Agent	Yeong-Pil Lee Hae-Yeong Lee
Inventor	Geun-Bae Im Hyeon-Hui Kim
Applicant	SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.
Title of Invention	The miniature gene analytical device using the multichannel PCR and electrophoresis.

Legal Status

Date of request for an examination	20010423
Notification date of refusal decision	00000000
Final disposal of an application	registration
Date of final disposal of an application	20040518
Patent registration number	1004388210000
Date of registration	20040624
Number of opposition against the grant of a patent	
Date of opposition against the grant of a patent	00000000
Number of trial against decision to refuse	
Date of requesting trial against decision to refuse	
Date of extinction of right	

Abstract

The present invention relates to the miniature gene analytical device for connecting the band analysis equipment for confirming the multichannel electrophoresis performing unit and the separated band having the multichannel PCR performing unit had, and a plurality of micro channels on one chip as the fluid and including the sample injection part,

According to the present invention, at the same time, the expression of different genes relating to a disease can be quantitatively inspected by using the multichannel PCR and electrophoresis on one chip.

Main Drawing(s)

Fig. 1

Description

■ Brief Description of Drawing(s)

Figure 1 is a top view in which it makes the micro channel (microchannel), and if it fixes different primer within each micro channel and it controls respective temperature, various genes of amplifications is possible on a multichannel at a time, and this schematically shows the structure of being connected to immediately, the electrophoresis of a plurality on the chip.

Figure 2 is a drawing showing basic concepts (the reverse transcription, various genes of amplifications according to the used primer, and the detection of the gene separated from the separation of a gene by the electrophoresis) in the series of the present invention.

Figure 3 is a top view which it enlarges in the case where RT-PCR is made as the embodiment only one micro channel, concretely it shows of the present invention.

The description E of the denotation about the main part of ö drawing.

1. Sample injection part 2. multichannel PCR performing unit.
3. Multichannel electrophoresis performing unit 4. preprocessing performing unit.
5. Micro channel 6. primer.
7. Thermal cycler (heater / sensor) 8. electrode.

■ Background Art

The present invention relates to the miniature gene analytical device for consecutively performing the gene amplification and electrophoresis on one chip, more particularly, to the miniature gene analytical device for connecting the band analysis equipment for confirming the multichannel electrophoresis performing unit and the separated band having the multichannel PCR performing unit had, and a plurality of micro channels as the fluid (in fluid communication) and including the sample injection part,

As to DNA having with the information of heredity of a man, after being transferred in a mRNA, it is translated into a protein and a protein acts in an organism. All genes are not revealed to the amount which is always same at all times to a mRNA while nots being transferred. And it is known that the expression of the luxury gene rapidly increases when being exposed to any kind of disease. Therefore, the state of a disease can be gotten a grip on by inspecting the mRNA expression ratio of a gene.

In order that this information of heredity was confirmed, if it separated a mRNA from a sample and after being busy, it separately used the PCR instrument and it amplified the reaction solution and the enzymes in which gene each primer for to inspecting after the keen in the reverse transcription were included and it set up the sample amplified on the electrophoresis kit and it set up a voltage, the amplified sample moved on a gel and a voltage was comprised a band, the conventional gene expression test coverage was this a detection. But this method was performed to a plurality of process discretes. Extracted the nucleic acid and was augmented with PCR and electrophoresed the error rate of each processes affected the whole procedure. In addition, it had the problem that it was familiar with moreover, lots of different fields including the chemistry, the molecular biology, a medicine etc.

Therefore, it had been having with an attempt minimized the cost and made an operation facilitated by accumulating processes which were various as to the gene diagnosis within the single process. By using a channel of a plurality, it discloses the gene analytical device which US6043080 A includes in the azygous miniature body. But it has the disadvantage at the same time, US6043080 A amplifies various genes by adopting only the single channel and single PCR chamber and, that it cannot confirm. Moreover, there is a problem that US5876978 A is comprised of the target gene, and each compartment is the vial (glass vial) the multiplex PCR process at the same time, of amplifying the housekeeping gene and competitive mold is disclosed and the loss of a sample comes while it is made of the capillary tube only a connection and it becomes the amount of a sample over 40 ul.

Thus, if these inventors made the multichannel on the chip and it fixed different primer to a channel and it controlled respective temperature, it took notice of the point that various genes of amplifications was possible at a time on a multichannel. It told because of completing the present invention. According to the present invention, an effectuation is consecutively the expression of the different gene which concerns with a disease by quantitatively analyzing the band which is obtained in the electrophoresis while it can prevent the loss and contamination of a sample since the gene amplified in each channel is automatically connected to the electrophoresis, possible after the sample injection to an amplification, the electrophoresis and analysis on a chip. That is, conventionally, in the sample of one man, when to inspecting the expression of the different gene, it needed the sample of the bulk about each primer and the expression had to amplify through respective other cycle. However, since since the reaction occurs on the micro channel an inspection being possible through a small amount of sample and being comprised of a multichannel and fixing other primer to each channel and independently controlling a temperature, at the same time, the apparatus of the present invention can amplify the different gene.

■ Technical Task

Therefore, an object of the present invention is to provide the miniature gene analytical device it overcomes the problem of the prior art, and therefore, for various genes of amplifications being possible at a time and this being connected to immediately, the electrophoresis and at the same time, confirming the different kinds gene on a multichannel on a real time basis.

Moreover, an object of the present invention is to provide the method for effectively diagnosing the gene disease at the same time, by it amplifies a plurality of genes by using the miniature gene analytical device and analyzing

■ Structure and Function of the Invention

To accomplish the above objects, the present invention is to provide the miniature gene analytical device in which it connects the multichannel electrophoresis performing unit having a plurality of micro channels consecutively connected to the multichannel PCR performing unit : ③ PCR performing unit having a plurality of micro channels consecutively connected to ① sample injection part : ② sample injection part to the fluid (in fluid communication) and it includes, and each micro channel of the multichannel PCR performing unit contains different primer and the temperature control is independently possible.

The present invention is characterized that at the same time, a plurality of genes is amplified since different primer is contained in the

multichannel PCR performing unit and the temperature control is independently possible. A plurality of genes is moved to the multichannel electrophoresis performing unit and amplified at the same time, it becomes with electrophoresis. Therefore, at the same time, the different kinds gene can be separated on a real time basis and it can confirm.

As to analysis equipment of the present invention, the sample injection part is the entrance which injects a sample within the analysis equipment while preventing the contamination of a sample by the external component. The injection is performed generally by directly scanning a sample within the sealing valve. The sample which can be used for the gene analytical device of the present invention can become not only the nucleic acid like DNA or RNA but also the blood, the spittle, a cell, the tissue equivalent extracting the nucleic acid. Moreover, this sample injection part provides a reagent including the neutralization of the infectious agent, the stabilization of a sample, the pH control etc.

As to analysis equipment of the present invention, the preprocessing performing unit for the PCR performance can be included between the sample injection part and multichannel PCR performing unit to an addition. The nucleic acid extraction from a cell, and a denaturation, a refinement, a filtering, a desalination etc of the DNA-binding protein can be given about the preprocessing performing unit which can be included in the analysis equipment of the present invention.

Preferably, the preprocessing performing unit of the analysis equipment of the present invention is characterized that it is the reverse transcription performing unit for performing RT-PCR. This RT-PCR makes it possible to directly inspect the expression ratio of a gene from a mRNA. The reverse transcription performing unit of the present invention is equipped with DNTPs (A dATP, a dGTP, and a dCTP and dTTP) of 4 kind and the reverse transcriptase having a mRNA to a cDNA with the kill number in the reverse transcription.

As to analysis equipment of the present invention, while the multichannel PCR performing unit is made of a plurality of micro channels, each micro channel can contain different primer and the temperature control is independently possible and at the same time, a plurality of genes can be amplified. As to PCR performed in the multichannel PCR performing unit of the present invention, in order to prevent the nested PCR which excludes the non-specific amplification by using the conventional PCR, RT-PCR, and overlapping primers, and the amplification which does not desire by the non-specific binding of the DOP (degenerate oligonucleotide primer) PCR obtaining the DNA fragment of the gene coding the protein to the natural disposition or the mold (template) and primer, first of all, the amplification heat up the polymerase addition former PCR mixture with the high temperature and the amplification add with polymerase and PCR can be the hot-start PCR.

In analysis equipment of the present invention, the multichannel electrophoresis performing unit is made of a plurality of micro channels. And each micro channel is directly connected to each micro channel of the multichannel PCR performing unit (multichannel mode). A plurality of genes moves to a gel-like and amplified it can become immediately, the electrophoresis. It is preferable that the electrophoresis performed in the electrophoresis performing unit of the present invention is the capillary electrophoresis. The capillary electrophoresis uses or the micro channel of about 25um - 75um. And it induces the electroosmotic flow by adding a voltage to both end. As to the capillary electrophoresis, while generating minimum heat while preventing an affect due to the Joule heat generation, it can set up the high electric field and it makes the quick separation possible.

Each reactive part in the analysis equipment of the present invention is equipped with the electrode in both end a voltage is authorized through the micro channel it is connected to the fluid through the micro channel (in fluid communication). The flow of a solution can be controlled with the electroosmotic flow which makes into the flow of a solution if it sets up a voltage on the multichannel both ends without the separate pump or the valve.

Analysis equipment of the present invention more can include the band analysis equipment for confirming the band separated from the electrophoresis performing unit. This band analysis equipment provides the interface based with computer for interpreting obtained data with the reading wand for scanning data of the apparatus and obtaining and controlling the apparatus. This band analysis equipment is together mounted on a chip of the present invention or it can exist independently of a chip of the present invention.

Moreover, to accomplish the above objects, dissimilar. And the present invention is to provide the manufacturing method of the miniature gene analytical device of the present invention mounts the thermal cycler to ① chip within the step : ② multichannel making the sample inlet and multichannel and includes the step making the PCR performing unit, and the step filling a matrix within ③ multichannel and connects an electrode to both end and makes the electrophoresis performing unit.

Referring to the figure, below, and the manufacturing method of miniature gene analytical device of the present invention decide to be circumstantially illustrated.

1. The Holotrichia of the multichannel in on chip.

As to the body of the present invention apparatus, by using a method and the material which is suitable for the microfabrication technique (microfabrication techniques), generally the material can be assembled. For example, the body of the present invention apparatus provides a plurality of plane films consists of the crystalline substrate including the part injection-molded into the various polymer material or the silicon, the glass etc. In case of the silica, and the crystalline substrate such as the glass and silicon, in order to produce a well and the various channel of in the apparatus, an etching, the milling, the drilling etc. can be used. The microfabrication technique used for the semiconductor industry area can be applied to these materials or a method. These technologies provides for example, the electrodeposition, the low pressure plating (low-pressure vapor deposition), the photo lithography (photolithography), an etching, the laser drilling etc.

Particularly the etching of the substrate using the photo lithography is suitable for microfabrication of the present invention. For example, the first substrate is superposed with a photoresist. The electromagnetism ray is irradiated through the lithography mask and a photoresist is exposed to the pattern like a channel and/or the chamber of the apparatus. After a well and the channel etching the exposed substrate and desires are produced, other plane film is covered on the first substrate and the channel bind. Generally, the desirable photoresist provides the electron-beam resist like the polymethyl metacrylate (PMMA) and derivative, and poly (olefin sulfone) etc.

Preferably, as to body of the present invention, the part of the silica etched with the part including the plastic etc. injection-molded or the silicon plane film is combined and the part can be made. For example, whereas the hole like the sample inlet (1) of the present invention and preprocessing performing unit (4) or the chamber is formed with the injection molding technique, it has the multichannel PCR performing unit (2) and each micro channel (5) comprised the multichannel electrophoresis performing unit (3) in the plate glass, and the silica, the silicon chip, or the top of the substrate with an etching with the microfabrication number.

2. The Holotrichia of the multichannel PCR performing unit.

The PCR (Polymerase chain reaction) repeats the DNA polymerase chain reaction having the specific DNA domain in an interval by the primer of 2 kind and DNA synthetase in vitro. It refers the method for amplifying to the specific DNA domain to the several hundred of thousand times. Generally, as shown in RT-PCR is fig. 2 one cycle of the PCR process is made of the step separating the double strand DNA according to the single strand, the step annealing the primer placing the target area in an interval of 2 kind in the separated single-stranded DNA, and the step extending a primer and synthesizes the sequence, the step forcing a mRNA in a cDNA before the PCR process of being general as described above with the reverse transcription (reverse transcription) is more included. The step extending a primer and synthesizes the sequence is a complementary in the target area.

In the polymerase chain reaction method, the double-strand separation is comprised of the high temperature (heating) (over 90°C). Relatively the primer binding (50~60°C) and DNA synthesis (70~75°C) are made in the low temperature (cooling). Therefore, it is necessary to have the thermal cycler in order to consecutively perform the PCR process.

In the present invention, while including different primer (6) in order to make the multichannel PCR performing unit (2), a plurality of micro channels (5) is manufactured it is possible. Here, each micro channel comprises the independent PCR performing unit. Therefore, it builds the heater (7) which can raise a temperature inside a channel in order to make the thermal cycler at the micro channel and the temperature sensor (7') controlling the temperature.

The thin film resistive heater etc. can be used as the heater (7) the manufacturing method is known to the relevant industry. As to this heater, by coating with the metallic film connected to the power source to the lower part or the inside of the PCR performing unit it can be manufactured. Moreover, the resistivity thermometer, the thermister (thermistors), the integrated circuit temperature sensor, *** (quartz) thermometer etc including the thermocouple having the bimetal junction producing the temperature dependency electromotor power (EMF) to the temperature sensor (7'), and the material having the electric resistance of the temperature proportion can be used. This temperature sensor can be connected with the computer which is programmed to the time / temperature profile predetermining in order to indicate a rising and degradation of a temperature.

Preferably, it is good to thermal cycler (7) of the present invention to use the Peltier element (Peltier Device) with an heater. Here, the Peltier element does the function of fitting the temperature desiring to an heater after amending the cardinal temperature. If this Peltier element forms a loop-line into the metal of the different kind and the metal spills a current on the loop in-between, the heat is generated in one side junction and it uses the peltier effect absorbing the heat in the other group.

Moreover, the PCR performing unit (2) can contain the synthetic primer, and enough amplification agent like dNTPs (A dATP, a dGTP, and a dCTP and dTTP) of 4 kind of the temperature dependency DNA synthetase and amount. Here, it is preferable that the synthetic primer is synthesized in order to have the sequence uniting with both end of the target gene. And it manufactures different primer according to the gene desiring the analysis at the micro channel and it uses. The taq polymerase etc. can be used as the temperature dependency DNA synthetase. These primer and DNA synthetases can be kept in an in-channel with a buffer to the liquid in order to fix within the PCR performing unit. And preferably these primer and DNA synthetase can be coupled in the channel inner wall or appropriate the solid support.

Preferably, in the post analysis step, the nucleic acid can be in the PCR amplification step the labeling in order to make the detection of a gene facilitated. And the primer which for this, is marked or the marked dNTPs can be used.

3. The Holotrichia of the multichannel electrophoresis performing unit.

The electrophoresis indicates that the differential migration of different sample element divides in the electric field. In the present invention, in order that the multichannel electrophoresis performing unit (3) is made, the gel is filled within a plurality of micro channels (5) and connected to the PCR performing unit and multichannel mode the electrode (8) is set up on the end part of a multichannel. In this way, by doing the sample coming after PCR can be immediately classified.

Preferably, the electrophoresis performing unit is good to use the capillary electrophoresis apparatus (capillary electrophoresis). The capillary electrophoresis uses the capillary tube or the micro channel of about inside diameter 25um ~ 75um which is filled with the specific isolation medium (separation medium) or which it does not fill. The separation method of the nucleic acid using the capillary electrophoresis is described in for example, for example, Woolley and Mathies, the Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1994) 91:11348-11352 etc. And for your reference, these contents includes in this specification. The capillary electrophoresis provides the quick method for the analysis of the PCR amplification product. The rate of the high surface area large volume of these capillary tubes allow the approval of the high electric field through the capillary tube without the substantial heat change (thermal variation). It allows the consequently more quick separation. Furthermore, when it is combined with the confocal imaging method, the sensitivity of the range of the attomol (attomoles) can compare to the sensitivity of the radioactive sequencing process is provided these methods.

In many capillary electrophoresis method, the capillary tube is filled with appropriate the separation matrix. And is known to the relevant industry for example, an hydroxyethylcellulose, a polyacrylamide, an agarose etc. can be given of that matrix. Generally, the specific gel matrix, and the running buffer and running condition are selected in order to maximize the isolation of the special use. For example, the running buffer provides the denaturant (denaturants), for degenerating the nucleic acid of a sample the chaotropic agent (chaotropic agents) like the urea etc.

The manufacturing method of the capillary electrophoresis apparatus is circumstantially described in Jacobsen, et al., the Anal. Chem. (1994) 66:1114-1118, effenhauser, et al, anal. Chem. (1994) 66:2949-2953 etc. for example. And these are included in this specification as reference materials. These methods include the silica, and the thing etching the channel of the micron scale in the silicon, the other crystalline board, or on chip with the photo lithography (photolithographic). And these methods can be easily used to the apparatus of the present invention.

4. The Holotrichia of the band analysis equipment.

The analysis equipment of the present invention is equipped with the interface based with computer for interpreting obtained data with the reading wand for scanning the band separated from the electrophoresis performing unit and obtaining data and controlling the apparatus.

Here, the reading wand detects the separation information of the individual size band coming out of electrophoresis performing unit of the present invention. The general interpretation method which is known to the relevant industry can be used as the reading wand. For example, by using the charge coupled device (charged coupled device, "CCD") for the wide range scanning of an array after scanning by using the laser exciting the target gene labeled by fluorescence, the charge coupled device (charged coupled device, "CCD") can image. And by using the laser confocal microscope combining the simplicity of the automated process and speed and high-resolution detectivity, data can be collected from an array.

Data collected in the reading wand is transmitted to the digital computer for data analysis. Typically, transmitted data from the reading wand is stored. It is programmed so that the computer analyze and it report. And it interprets for example, the fluorescent date and it quantitatively analyzes the expression ratio of a gene, or the expression ratio can decide the gene sequence. The interpretation of this data can find out the existence of not only the diagnosis of the gene disease but also the virus or the bacteria.

Moreover, to accomplish the above objects, dissimilar. And the present invention is to provide the gene analysis method in which it includes the step analyzing the gene separated with the step : ⑤ the amplified gene moving with the step : ④ the gene increased with the step : ③ the nucleic acid flowed in with the step : ② the sample in which ① nucleic acid is included is flowed in into the multichannel PCR performing unit in which the specific primer is fixed according to each micro channel is amplified in the multichannel PCR performing unit with the gene is moved to the multichannel electrophoresis performing unit according to each micro channel is separated from the multichannel electrophoresis performing unit, and the amplification of the nucleic acid, and the electrophoresis and analysis are consecutively performed on one chip.

As shown in fig. 3, if a mRNA is injected into the sample injection part (first inlet port), it moves according to a channel and if the reverse transcriptase is injected in the preprocessing performing unit (second inlet port), the reverse transcription is made. As to the cDNA transcribed reversely, after moving according to a channel, it reacts to the primer having within the multichannel PCR performing unit and since a temperature is independently controlled at each channel, respective other gene is amplified. The amplified gene again moves according to a channel and the electrophoresis is on the gel within the multichannel electrophoresis performing unit. By confirming the band of the gene which becomes with electrophoresis and is separated at the band analysis equipment the amount of gene expression can be inspected.

As to analytical method of the present invention, the step analyzing the separated gene is possible, in addition it confirms the kind of a gene as the individual size at the same time, the kind quantitatively analyzes the expression of the luxury gene. That is, if a band is quantitatively analyzed after electrophoresing on a gel to amplify a mRNA to RT-PCR, the expression profile of respective gene can be looked at.

As to miniature gene analytical device, by inspecting the expression of the different gene relating to a disease at a time at the same time, the expression diagnoses the different gene disease but it can be usefully used. For example, in the blood sample, if a mRNA is extracted and it injects into a chip, it is transcribed reversely and a cDNA is made and the primer about the different gene passes through the thermal cycler having with anchored and this is amplified. Since the amplified gene is connected on a channel to immediately, the electrophoresis and it confirms a band at the same time, it quantitatively can confirm the gene related to a disease.

■ Effect of Invention

In the above, as shown in it looked into, when to inspecting the expression of the different gene in the sample of one man, it needed the sample of the bulk about each primer and conventionally the expression had to amplify through respective other cycle. However, since since the reaction occurs on the micro channel (microchannel) being possible through a small amount of sample and being comprised of the multichannel and fixing other primer to each channel and independently controlling a temperature, at the same time, analysis equipment of the present invention can amplify the different gene.

Moreover, by quantitatively analyzing the band which is obtained in the electrophoresis while it can prevent the loss and contamination of a sample since the gene amplified in each channel is automatically connected to the electrophoresis the expression of the different gene concerning with a disease can be inspected. In addition, an effectuation is consecutively available in one on chip after the sample injection to an amplification, the electrophoresis and analysis.

In conclusion, according to the present invention, it has the effect that the independent thermal cycler which extracts one sample and fixing various primers is used. At the same time, the expression of the different gene can be inspected. And the reverse transcription of a cDNA and gene amplification and electrophoresis and detection consecutively can occur in a mRNA on a chip. And the loss and contamination of the sample occurring in the movement (Transfer) can be prevented. And the detection function is utilized and the analysis of being quantitative of the electrophoresis each band becomes possible. And at the same time, the expression of different genes relating to a disease can be quantitatively inspected by using the multichannel RT-PCR and electrophoresis on a chip.

Claims**■ Claim 1:**

① The miniature gene analytical device, wherein the multichannel PCR performing unit the multichannel electrophoresis performing unit having the micro channel having the micro channel of the sample injection part : ② plurality of the multichannel PCR performing unit : ③ plurality is connected to the fluid to one body (in fluid communication) contains different primer at each micro channel and the temperature control is independently possible.

■ Claim 2:

The miniature gene analytical device of claim 1, wherein the preprocessing performing unit for the PCR performance is included between the sample injection part and multichannel PCR performing unit to an addition.

■ Claim 3:

The miniature gene analytical device with a feature a thing of claim 2, wherein the preprocessing performing unit is the reverse transcription performing unit for performing RT-PCR.

■ Claim 4:

The miniature gene analytical device with a feature a thing of claim 1, wherein the electrophoresis performed in the multichannel electrophoresis performing unit is the capillary electrophoresis.

■ Claim 5:

The miniature gene analytical device of claims 1 through 4, further comprising the band analysis equipment for confirming the band separated from the electrophoresis performing unit.

■ Claim 6:

① The manufacturing method of the miniature gene analytical device of the claims 1 through 4 mounting the thermal cycler to a chip within the step : ② multichannel making the sample inlet and multichannel and includes the step making the PCR performing unit, and the step filling a matrix within ③ multichannel and connects an electrode to both end and makes the electrophoresis performing unit.

■ Claim 7:

The method of claim 6, wherein a multichannel is made with the etching (etching) on the silicon wafer by using the photo lithography (photolithography).

■ Claim 8:

The manufacturing method of claim 6, wherein the thermal cycler mounted on the PCR performing unit together uses an heater and Peltier element.

■ Claim 9:

The manufacturing method of claim 6, wherein the matrix within the electrophoresis performing unit is the gel.

■ Claim 10:

① The gene analysis method wherein the step analyzing the gene which is the gene moving with the step : ④ moves the gene which is the nucleic acid flowed in with the step : ② inflows the sample in which the nucleic acid is contained to the multichannel PCR performing unit in which the specific primer is fixed amplified in the multichannel PCR performing unit with the step : ③ it makes augmented with the gene to the multichannel electrophoresis performing unit separated from the multichannel electrophoresis performing unit with the step : ⑤ it separates between is included; and the amplification of the nucleic acid, and the electrophoresis and analysis are consecutively performed on one chip.

■ Claim 11:

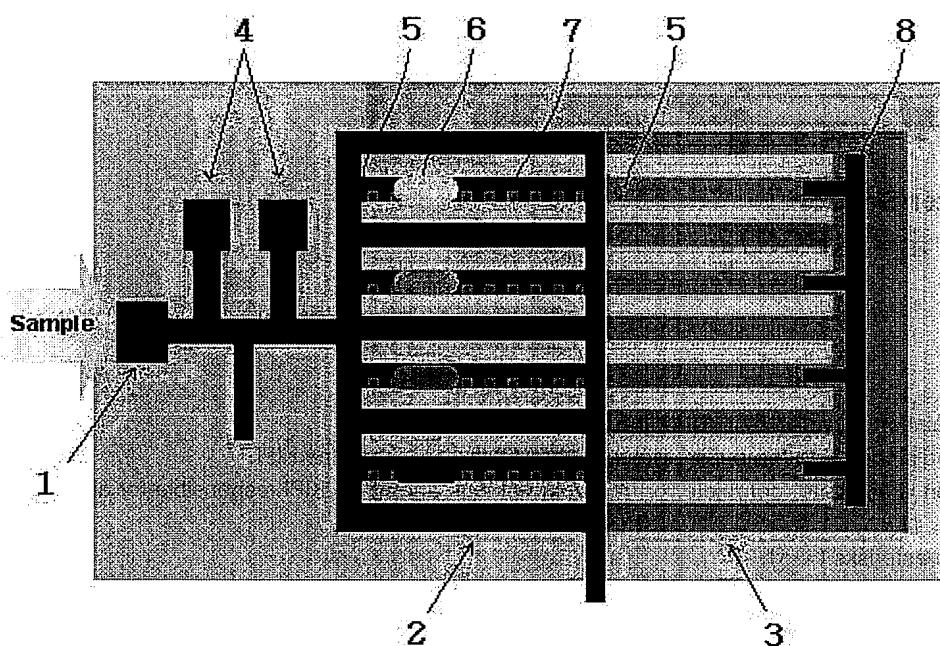
The method of claim 10, wherein in the multichannel PCR performing unit, at the same time, a plurality of genes is amplified; and a plurality of genes is moved to the multichannel electrophoresis performing unit according to the micro channel and amplified at the same time, it is separated with electrophoresis.

■ Claim 12:

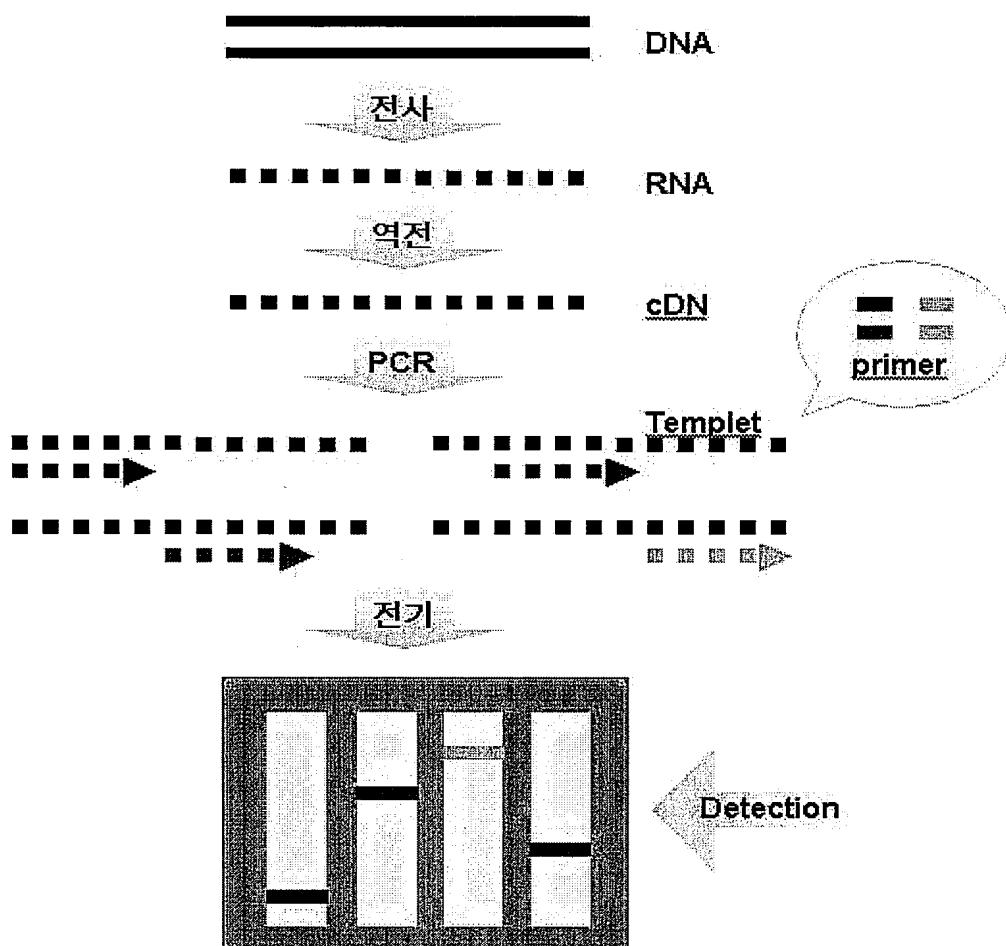
The method diagnosing the gene disease as to claim 10 but is used.

Drawing

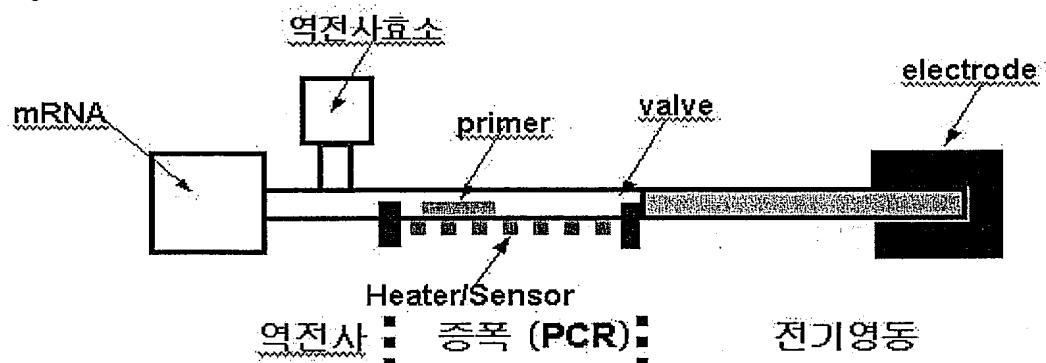
■ Fig. 1



■ Fig. 2



■ Fig. 3



Disclaimer

This English text above is machine translation provided by KIPI for information only.

It cannot be used for legal purposes or distributed to the public without prior written consent of the KIPI.

KIPI does not warrant that this translation is accurate, complete, or free from defects, and nor is KIPI responsible for any damage related to this translation.

Not-translated word will be marked with asterisks (***)�.

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl.⁷
C12Q 1/68(11) 공개번호 특2002-0082022
(43) 공개일자 2002년 10월 30일

(21) 출원번호	10-2001-0021753
(22) 출원일자	2001년 04월 23일
(71) 출원인	삼성전자 주식회사
(72) 발명자	경기 수원시 팔달구 매탄3동 416번지 임근배 경기도 수원시 팔달구 영통동 황골마을 풍림 아파트 232동 1205호 김현희 부산광역시 연제구 거제3동 경남아파트 5동 806호
(74) 대리인	이영필, 이해영

심사청구 : 있음

(54) 멀티채널 PCR과 전기영동을 이용한 소형 유전자 분석장치

요약

본 발명은 샘플 주입부, 복수의 마이크로채널을 갖는 멀티채널 PCR 수행부, 복수의 마이크로채널을 갖는 멀티채널 전기영동 수행부, 및 분리된 밴드를 확인하기 위한 밴드 분석장치를 하나의 칩 상에 유동적으로 연결하여 포함하는 소형 유전자 분석 장치에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 하나의 칩 상에서 멀티채널(multichannel) PCR과 전기영동을 이용하여 질병과 관련된 여러 유전자들의 발현을 정량적으로 동시에 검사할 수 있다.

대표도**도 1****형세서****도면의 간단한 설명**

도 1은 칩(chip) 위에 복수의 마이크로채널(microchannel)을 만들고, 각 마이크로채널내에 서로 다른 프라이머를 고정시키고 각각 온도를 조절하면, 멀티채널 상에서 한번에 다양한 유전자의 증폭이 가능하며, 이것이 바로 전기영동으로 연결되는 구조를 개략적으로 나타낸 상면도(top view)이다.

도 2는 본 발명의 기본 개념(역전사, 사용된 프라이머에 따른 다양한 유전자의 증폭, 전기영동에 의한 유전자의 분리 및 분리된 유전자의 검출)을 일련으로 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일실시에로서 RT-PCR이 이루어지는 경우에서, 하나의 마이크로채널만을 확대하여 보다 구체적으로 나타낸 상면도이다.

<도면의 주요부분에 대한 부호의 설명>

1. 샘플 주입부	2. 멀티채널 PCR 수행부
3. 멀티채널 전기영동 수행부	4. 전처리 수행부
5. 마이크로채널	6. 프라이머
7. 열순환기(히터/센서)	8. 전극

발명의 상세한 설명**발명의 목적****발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술**

본 발명은 하나의 칩 상에서 유전자 증폭 및 전기영동을 연속적으로 수행할 수 있는 소형 유전자 분석 장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 샘플 주입부, 복수의 마이크로채널을 갖는 멀티채널 PCR 수행부, 복수의 마이크로채널을 갖는 멀티채널 전기영동 수행부, 및 분리된 밴드를 확인하기 위한 밴드 분석장치를 유동적으로 연결하여(in fluid communication) 포함하는 소형 유전자 분석 장치에 관한 것이다.

사람의 유전정보를 가지고 있는 DNA는 mRNA로 전사된 후 단백질로 번역되어 생체에서 작용한다. 모든 유전자가 항상 mRNA로 전사되는 것은 아니며 항상 동일한 양으로 발현되지도 않는다. 또 어떤 질병에 노출되었을 때 특정유전자의 발현이 급속히 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 유전자의 mRNA 발현량을 검사함으로 질병의 상태를 파악할 수 있다.

이러한 유전정보를 확인하기 위하여, 종래의 유전자 발현검사방법은 샘플에서 mRNA를 분리하여 역전사시킨 후 검사하고자 하는 유전자 각각의 프라이머(primer)들이 포함된 반응용액 및 효소들을 따로 분주한 후 PCR 기계를 이용하여 각각 증폭하고 증폭한 시료를 전기영동 kit에 걸어서 전압을 걸어주면 증폭된 시료가 gel상에서 이동하여 band를 이루면 이것을 detection하였다. 그러나, 이러한 방법은 핵산을 추출하고 PCR 증폭하고 전기영동하는 복수의 공정들이 별개로 수행되어, 각 공정들의 에러율이 전체공정에 영향을 줄뿐만 아니라, 또한 화학, 분자생물학, 의약 등과 같은 다수의 서로 다른 분야들에 의숙해져야 한다는 문제점을 가지고 있었다.

따라서, 유전자 진단에 있어 다양한 프로세스들을 단일 공정내로 집적함으로써 비용을 최소화하고 작동을 용이하게 하기 위한 시도들이 있어왔다. 미국특허 6043080은 복수의 서로 다른 반응 챔버들을 채널을 이용하여 단일의 소형 몸체에 포함시킨 유전자 분석 장치를 개시하고 있으나, 단일채널과 단일 PCR 챔버만을 채택함으로써 여러 가지 유전자를 동시에 증폭 및 확인할 수 없다는 단점이 있다. 또한, 미국특허 5876978는 표적유전자, 하우스키핑 유전자 및 경쟁적 주형을 동시에 증폭하는 멀티플렉스 PCR 공정을 개시하고 있으나, 각 구획이 유리병(glass vial)으로 구성되고 연결만이 모세관(capillary)으로 이루어져서 시료의 량이 40㎕ 이상이나 되며 시료의 손실이 발생되는 문제점이 있다.

이에, 본 발명자들은 칩(Chip)위에 멀티채널(multichannel)을 만들어 채널마다 서로 다른 프라이머(primer)를 고정시키고 각각 온도를 조절하면 멀티채널 상에서 한번에 다양한 유전자의 증폭이 가능하다는 점에 착안하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 본 발명에 의하면, 각 채널에서 증폭된 유전자가 자동으로 전기영동에 연결되므로 시료의 손실과 오염을 방지할 수 있으며 전기영동에서 얻어진 밴드(band)를 정량적으로 분석함으로써 질병에 관계한 여러 유전자의 발현을 시료주입 후 증폭과 전기영동과 분석까지 연속적으로 칩 상에서 수행이 가능하다. 즉, 종래에는 한 사람의 샘플에서 여러 유전자의 발현을 검사하려 할 때 각각의 프라이머에 대해 대량의 시료가 필요하며 각각 다른 사이클(cycle)을 통해 증폭을 해야 하였지만, 본 발명의 장치는 마이크로채널 상에서 반응이 일어남으로 소량의 시료로도 검사가 가능하며 멀티채널로 구성되어 각 채널에 다른 프라이머를 고정시키고 독립적으로 온도를 조절하므로 여러 유전자를 동시에 증폭시킬 수도 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 상기 종래기술의 문제점을 극복하기 위한 것으로, 멀티채널 상에서 한번에 다양한 유전자의 증폭이 가능하며 이것이 바로 전기영동으로 연결되어 실시간으로 여러가지 유전자를 동시에 확인할 수 있는 소형 유전자 분석 장치를 제공하는데 있다.

또한, 본 발명의 목적은 상기 소형 유전자 분석장치를 이용하여 복수의 유전자를 동시에 증폭하고 분석함으로써 유전자 질병을 효과적으로 진단할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 ① 샘플 주입부: ② 샘플 주입부에 연속적으로 연결된 복수의 마이크로채널을 갖는 멀티채널 PCR 수행부: ③ PCR 수행부에 연속적으로 연결된 복수의 마이크로채널을 갖는 멀티채널 전기영동 수행부를 유동적으로 연결하여(in fluid communication) 포함하며, 상기 멀티채널 PCR 수행부의 각 마이크로채널은 서로 다른 프라이머(primer)를 내포하고 독립적으로 온도 조절이 가능한 것을 특징으로 하는 소형 유전자 분석 장치를 제공한다.

본 발명은, 멀티채널 PCR 수행부에 서로 다른 프라이머를 내포하고 독립적으로 온도조절이 가능함으로써 복수의 유전자가 동시에 증폭되고, 증폭된 복수의 유전자가 멀티채널 전기영동 수행부로 이동되어 동시에 전기영동되는 것을 특징으로 한다. 이로써, 실시간으로 여러가지 유전자를 동시에 분리하고 확인할 수 있다.

본 발명의 분석 장치에 있어서, 샘플 주입부는 외부요소에 의한 샘플의 오염을 방지하면서 샘플을 분석 장치내로 주입하는 입구로서, 주입은 일반적으로 밀봉 벨브내로 샘플을 직접 주사함으로써 수행된다. 본 발명의 유전자 분석장치에 사용될 수 있는 샘플은 DNA 또는 RNA와 같은 핵산뿐만 아니라 핵산을 추출할 수 있는 혈액, 타액, 세포, 조직 등도 될 수 있다. 또한, 이러한 샘플 주입부는 감염성 물질의 중화, 샘플의 안정화, pH 조절 등을 위한 시약을 포함할 수도 있다.

본 발명의 분석 장치에 있어서, 샘플 주입부와 멀티채널 PCR 수행부 사이에는 PCR 수행을 위한 전처리 수행부가 추가로 포함될 수도 있다. 본 발명의 분석 장치에 포함될 수 있는 전처리 수행부로는 세포로부터의 핵산 추출, DNA 결합 단백질의 변성, 정제, 여과, 탈염 등을 들 수 있다.

바람직하게는, 본 발명의 분석장치의 전처리 수행부는 RT-PCR을 수행하기 위한 역전사(reverse transcription) 수행부인 것을 특징으로 한다. 이러한 RT-PCR은 mRNA로부터 유전자의 발현량을 직접 검사하는 것을 가능하게 한다. 본 발명의 역전사 수행부는 mRNA를 cDNA로 역전사시킬 수 있는 역전사효소 및 4종류의 dNTPs(dATP, dGTP, dCTP 및 dTTP)를 포함할 수 있다.

본 발명의 분석 장치에 있어서, 멀티채널 PCR 수행부는 복수의 마이크로채널로 이루어지며 각 마이크로채널은 서로 다른 프라이머를 내포하고 독립적으로 온도조절이 가능하여 복수의 유전자가 동시에 증폭될 수 있다. 본 발명의 멀티채널 PCR 수행부에서 실시되는 PCR은 conventional PCR, RT-PCR, overlapping 프라이미더들을 사용하여 비특이적 증폭을 배제하는 nested PCR, 아미노산 서열정보를 바탕으로 그 단백질을 코드하는 유전자의 DNA 단편을 얻을 수 있는 DOP(degenerate oligonucleotide primer) PCR, 또는 주형(template)과 프라이머의 비특이적 결합에 의한 원하지 않는 증폭을 막기 위해 중합효소 첨가 전 PCR

mixiture를 고온으로 일단 가열하고 중합효소 첨가하여 PCR하는 hot-start PCR일 수 있다.

본 발명의 분석 장치에서, 멀티채널 전기영동 수행부는 복수의 마이크로채널로 이루어지며, 각 마이크로채널은 멀티채널 PCR 수행부의 각 마이크로채널과 직접 연결되어(multichannel mode), 증폭된 복수의 유전자가 겔상으로 이동하여 바로 전기영동이 될 수 있다. 본 발명의 전기영동 수행부에서 실시되는 전기영동은 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)인 것이 바람직하다. 모세관 전기영동은 25μm - 75μm 정도의 매우 작은 모세관이나 마이크로채널을 사용하며, 양 말단에 전압을 가함으로써 전기삼투적 흐름(electroosmotic flow)을 유발한다. 모세관 전기영동은 Joule 열 발생으로 인한 영향을 막을 수 있으며 최소한의 열을 발생시키면서 높은 전기장을 걸어줄 수 있어 신속한 분리를 가능하게 한다.

본 발명의 분석 장치에서, 각 반응부는 마이크로채널을 통해 유동적으로 연결되고(in fluid communication), 마이크로채널에 걸쳐 전압을 인가하기 위해 양 말단에 전극을 포함하고 있다. 멀티채널 양단에 전압을 걸면 용액의 흐름을 만드는 모세관 전기삼투현상(electroosmotic flow)에 의하여 별도의 펌프나 밸브 없이도 용액의 흐름을 제어할 수 있다.

본 발명의 분석 장치는 전기영동 수행부에서 분리된 밴드를 확인하기 위한 밴드 분석장치를 더 포함할 수 있다. 이러한 밴드 분석장치는 장치의 데이터를 스캐닝하여 수득하기 위한 판독 장치와 수득된 데이터를 해석하고 장치를 제어하기 위한 컴퓨터 기초된 인터페이스를 포함할 수 있다. 이 밴드 분석장치는 본 발명의 칩에 함께 장착되거나 또는 본 발명의 칩과 별도로 존재할 수도 있다.

또한, 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ① 칩(chip)에 샘플 주입구 및 멀티채널을 만드는 단계; ② 멀티채널 내에 열 순환기(thermal cycler)를 장착하여 PCR 수행부를 만드는 단계; 및 ③ 멀티채널 내에 매트릭스를 채워 넣고 양 말단에 전극을 연결하여 전기영동 수행부를 만드는 단계를 포함하는 본 발명의 소형 유전자 분석장치의 제조방법을 제공한다.

이하, 본 발명의 소형 유전자 분석 장치의 제조방법을 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다.

1. 칩상에 멀티채널의 제조

본 발명 장치의 몸체는 일반적으로 미세조립 기술(microfabrication techniques)에 적합한 방법 및 재료를 사용하여 조립될 수 있다. 예컨대, 본 발명 장치의 몸체는 다양한 폴리머 재료로 사출성형된 부분 또는 실리콘, 유리 등의 결정성 기질으로 된 다수의 평면 막을 포함할 수 있다. 실리카, 유리 또는 실리콘과 같은 결정성 기질의 경우에, 장치내의 웰과 다양한 채널을 생성하기 위해 에칭, 밀링, 드릴링 등을 사용할 수 있다. 반도체 산업분야에 사용되는 미세조립 기술이 이를 재료나 방법에 적용될 수 있다. 이들 기술은 예컨대, 전기침착(electrodeposition), 저압증착(low-pressure vapor deposition), 광식판인쇄술(photolithography), 에칭, 레이저 드릴링 등을 포함한다.

광식판인쇄술을 이용한 기판의 에칭(식각)이 본 발명의 미세조립에 특히 적합하다. 예컨대, 제1 기판을 포토레지스트로 중첩시키고, 석판인쇄술 마스크를 통해 전자기 광선을 조사하여 포토레지스트를 장치의 챔버 및/또는 채널과 같은 패턴으로 노출시키고, 노출된 기판을 에칭하여 원하는 웰과 채널을 생성한 다음, 다른 평면 막을 제1 기판 위에 덮어 결합시킨다. 일반적으로 바람직한 포토레지스트는 폴리메틸 메타크릴레이트(PMMA) 및 그 유도체와, 폴리(올레핀 솔폰)과 같은 전자빔 레이저스트 등을 포함한다.

바람직하게는, 본 발명의 몸체는 사출성형된 플라스틱 등의 부분과 에칭된 실리카 또는 실리콘 평면 막의 부분이 조합되어 이루어질 수도 있다. 예컨대, 본 발명의 샘플 주입구(1) 및 전처리 수행부(4)와 같은 구멍 또는 챔버는 사출성형기술에 의해 형성되는 반면, 멀티채널 PCR 수행부(2) 및 멀티채널 전기영동 수행부(3)를 이루는 각각의 마이크로채널(5)은 평면 유리, 실리카 또는 실리콘 칩 또는 기판상에서 에칭에 의해 미세조립될 수 있다.

2. 멀티채널 PCR 수행부의 제조

PCR(Polymerase chain reaction)이란 특정 DNA 영역을 사이에 둔 2종류의 프라이머와 DNA 합성효소에 의한 DNA 합성반응을 시험관내에서 반복하여, 특정 DNA 영역을 수십만배로 증폭하는 방법을 말한다. 일반적으로 PCR 공정의 한 사이클은 이중가닥 DNA를 단일가닥으로 분리하는 단계, 분리된 단일가닥 DNA에 표적 영역을 사이에 둔 2종류의 프라이머를 어닐링시키는 단계, 프라이머를 연장하여 표적영역에 상보적인 서열을 합성하는 단계로 이루어지며, RT-PCR은 노 2에서 보는 바와 같이 상기 일반적인 PCR 공정 전에 mRNA를 cDNA로 역전사(reverse transcription)시키는 단계를 더 포함하고 있다.

PCR 방법에서, 이중가닥 분리는 고온(heating)(90°C 이상)에서 이루어지고, 프라이머 결합(50~60°C) 및 DNA 합성(70~75°C)은 상대적으로 저온(cooling)에서 이루어지므로, PCR공정을 연속적으로 수행하기 위해서는 열 순환기(thermal cycler)가 필요하다.

본 발명에서는 멀티채널 PCR 수행부(2)를 만들기 위해 서로 다른 프라이머(6)를 포함하며 각각 온도조절이 가능한 복수개의 마이크로채널(5)을 제조한다. 여기서 각각의 마이크로채널은 독립적인 PCR 수행부를 구성하므로, 마이크로채널마다 열 순환기를 만들기 위해 채널의 내부에 온도를 올릴 수 있는 히터(7)와 그 온도를 제어할 수 있는 온도센서(7')를 내장시킨다.

히터(7)로는 당업계에 제조방법이 알려진 박막 저항성 히터(thin film resistive heater) 등을 사용할 수 있다. 이 히터는 PCR 수행부의 아래 또는 내부에 전원과 연결된 금속 필름을 도포함으로써 제조될 수 있다. 또한, 온도센서(7')로는 온도의존성 전동기력(EMF)을 생성하는 바이메탈 접합을 갖는 서모커플, 온도비례의 전기 저항을 갖는 재료를 포함하는 저항성 서모미터, 서미스터(thermistors), IC 온도센서, 콰르츠(quartz) 서모미터 등을 사용할 수 있다. 이 온도센서는 미리 정해진 시간/온도 프로파일로 온도의 상승 및 저하를 지시하도록 프로그램화된 컴퓨터와 연결될 수 있다.

바람직하게는, 본 발명의 열순환기(7)로는 상기 히터와 함께 펠티어 소자(Peltier Device)를 사용하는 것이 좋다. 여기서, 펠티어 소자는 기본 온도를 보정한 후 히터로 원하는 온도를 맞추는 기능을 한다. 이러한 펠티어 소자는 이중의 금속으로 루프를 형성하고 루프 중간에 전류를 흘리면 한쪽 접합부에서는 열이

발생하고 다른 한쪽에서는 열을 흡수하는 펠티어 현상(Peltier effect)을 이용한 것이다.

또한, PCR 수행부(2)는 합성 프라이머, 온도 의존성 DNA 합성 효소, 및 충분한 양의 4종류의 dNTPs(dATP, dGTP, dCTP 및 dTTP)와 같은 증폭 시약을 내포할 수 있다. 여기서, 합성 프라이머는 표적 유전자의 양 말단에 결합할 수 있는 서열을 가지도록 합성되며, 분석을 원하는 유전자에 따라 마이크로채널마다 서로 다른 프라이머를 제조하여 사용하는 것이 바람직하다. 온도 의존성 DNA 합성 효소로는 *taq* 폴리머라제 등을 사용할 수 있다. PCR 수행부내에 고정시키기 위해 이를 프라이머와 DNA 합성 효소는 버퍼와 함께 액상으로 채널내에 보관될 수 있으며, 바람직하게는 채널 내벽이나 적당한 고상 지지체에 커플링될 수도 있다.

바람직하게는 후속 분석단계에서 유전자의 검출을 용이하게 하기 위해 PCR 증폭 단계에서 핵산을 라벨링(labeling)할 수도 있으며, 이를 위해 표지된 프라이머나 표지된 dNTPs를 사용할 수도 있다.

3. 멀티채널 전기영동 수행부의 제조

전기영동이란 전기장내에서 서로 다른 시료 성분의 시차 이동(differential migration)에 의해 분리되는 것을 말한다. 본 발명에서는 멀티채널 전기영동 수행부(3)를 만들기 위해, PCR 수행부와 멀티채널모드로 연결되는 복수의 마이크로채널(5) 내에 겔(gel)을 채워넣고 멀티채널의 끝 부분에 전극(8)을 걸어준다. 이렇게 함으로써 PCR 후에 나온 샘플이 곧바로 분리될 수 있다.

바람직하게는, 전기영동 수행부는 모세관 전기영동장치(capillary electrophoresis)를 사용하는 것이 좋다. 모세관 전기영동은 특정 분리 배지(separation medium)로 채워지거나 채워지지 않은 내경 25 μ m - 75 μ m 정도의 모세관 또는 마이크로 채널을 사용한다. 모세관 전기영동을 이용한 핵산의 분리방법은 예컨대, Woolley and Mathies, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA(1994) 91:11348-11352 등에 기술되어 있으며, 이들의 내용은 본 명세서에 참고로 포함한다. 모세관 전기영동은 PCR 증폭 산물의 분석을 위한 신속한 방법을 제공한다. 이들 모세관의 높은 표면적 대 부피의 비율은 모세관에 걸쳐 실질적인 열 변화(thermal variation) 없이 높은 전기장의 인가를 허용하여, 결과적으로 더욱 신속한 분리를 허용한다. 더욱이, 공조점(confocal) 이미징 방법과 조합될 때, 이를 방법은 방사성 시퀀싱 방법의 감도에 견줄 수 있는 아토몰(attomoles)의 범위의 감도를 제공한다.

많은 모세관 전기영동법에서, 모세관은 당업계에 알려진 적당한 분리 매트릭스(separation matrix)로 채워지며, 그러한 매트릭스의 예로는 하이드록시에틸 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 아가로스 등을 들 수 있다. 일반적으로 특정 겔(gel) 매트릭스, 러닝 버퍼 및 러닝 조건이 특정 용도의 분리 특성을 최대화하기 위해 선택된다. 예컨대, 러닝 버퍼는 샘플의 핵산을 변성시키기 위한 변성제(denaturants), 우레아와 같은 카오토리픽제(chaotropic agents) 등을 포함할 수 있다.

모세관 전기영동장치의 제조방법은 예컨대, Jacobsen, et al., Anal. Chem. (1994) 66:1114-1118, Effenhauser, et al., Anal. Chem. (1994) 66:2949-2953 등에 상세히 기술되어 있으며, 이들은 본 명세서에 참고자료로서 포함된다. 이들 방법은 실리카, 실리콘, 또는 기타 결정성 기판 또는 칩상에 마크론 규모의 채널을 광석판인쇄술(photolithographic) 애칭하는 것을 포함하며, 본 발명의 장치에도 쉽게 이용될 수 있다.

4. 밴드 분석장치의 제조

본 발명의 분석 장치는 전기영동 수행부에서 분리된 밴드를 스캐닝하여 데이터를 수득하기 위한 판독 장치와 수득된 데이터를 해석하고 장치를 제어하기 위한 컴퓨터 기초된 인터페이스를 포함할 수 있다.

여기서, 판독 장치는 본 발명의 전기영동 수행부에서 나온 크기별 밴드의 분리 정보를 검출한다. 판독장치로는 당업계에 알려진 일반적인 판독 방법을 사용할 수 있다. 예컨대, 형광 표지된 표적 유전자를 여기시키는 레이저를 사용하여 스캐닝한 후 어레이의 광범위한 스캐닝을 위한 전하 커플 장치(charged coupled device, 'CCD')를 이용하여 이미징할 수 있으며, 자동화 공정의 용이성 및 신속성과 고 해상 검출도를 조합시킨 레이저 공조점(confocal) 현미경을 이용하여 어레이로부터 데이터를 수집할 수도 있다.

판독 장치에서 수집된 데이터는 데이터 분석을 위한 디지털 컴퓨터로 전송된다. 전형적으로, 그 컴퓨터는 판독장치로부터의 전송된 데이터를 저장, 분석 및 보고할 수 있도록 프로그램화되며, 예컨대 형광 데이터를 해석하여 유전자의 발현량을 정량적으로 분석하거나, 유전자서열을 결정할 수도 있다. 이러한 데이터의 해석은 유전자 질병의 진단뿐만 아니라 바이러스나 박테리아의 감염여부도 밝혀낼 수 있다.

또한, 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 ① 핵산(nucleic acid)이 포함된 샘플이 각 마이크로채널을 따라 특정의 primer가 고정된 멀티채널 PCR 수행부로 유입되는 단계; ② 유입된 핵산이 멀티채널 PCR 수행부에서 유전자 증폭되는 단계; ③ 증폭된 유전자가 각 마이크로채널을 따라 멀티채널 전기영동 수행부로 이동되는 단계; ④ 이동된 증폭된 유전자가 멀티채널 전기영동 수행부에서 분리되는 단계; ⑤ 분리된 유전자를 분석하는 단계를 포함하며, 하나의 칩 상에서 핵산의 증폭, 전기영동 및 분석이 연속적으로 수행되는 것을 특징으로 하는 유전자 분석 방법을 제공한다.

도면 3에서 보는 바와 같이, 샘플 주입부(첫번째 주입구)에 mRNA를 주입하면 채널을 따라 이동하고 전처리 수행부(두 번째 주입구)에서 역전사효소가 주입되면 역전사가 이루어진다. 역전사된 상보적 DNA는 채널을 따라 이동한 후 멀티채널(multichannel) PCR 수행부내에 있는 프라이머와 반응하고 각 채널마다 온도가 독립적으로 조절되므로 각각 다른 유전자가 증폭된다. 증폭된 유전자는 다시 채널을 따라 이동하여 멀티채널 전기영동 수행부내의 겔 상에서 전기영동이 된다. 전기영동되어 분리된 유전자의 밴드(band)를 밴드 분석장치에서 확인함으로써 유전자 발현량을 검사할 수 있다.

본 발명의 분석 방법에 있어서, 분리된 유전자를 분석하는 단계는 유전자의 종류를 크기별로 확인할 뿐만 아니라 동시에 특정 유전자의 발현을 정량적으로 분석하는 것도 가능하다. 즉, mRNA를 RT-PCR로 증폭시킨 것을 겔 상에서 전기영동 한 후 밴드를 정량적으로 분석하면 각각 유전자의 발현 양상을 볼 수 있다.

본 발명에 따른 소형 유전자 분석장치는 질병과 관련된 여러 유전자의 발현을 한꺼번에 검사함으로써 여러 유전자 질병을 동시에 진단하는 데 유용하게 이용될 수 있다. 예컨대, 혈액 샘플(Blood sample)에서 mRNA를 추출하여 칩에 주입하면 역전사되어 cDNA를 만들고 이것이 여러 유전자에 대한 프라이머가 고정되어 있

는 열 순환기를 통과하여 각각 증폭된다. 이 증폭된 유전자는 채널 상에서 바로 전기영동으로 연결되어 밴드를 확인함으로 질병에 관련된 유전자를 동시에 정량적으로 확인할 수 있다.

발명의 효과

이상 살펴본 바와 같이, 종래에는 한 사람의 샘플에서 여러 유전자의 발현을 검사하려 할 때 각각의 프라이머에 대해 대량의 시료가 필요하며 각각 다른 사이클을 통해 증폭을 해야 했지만, 본 발명의 분석 장치는 마이크로채널(microchannel)상에서 반응이 일어남으로 소량의 시료로도 가능하며 멀티채널(multichannel)로 구성되어 각 채널마다 다른 프라이머를 고정시키고 독립적으로 온도를 조절함으로 여러 유전자를 동시에 증폭시킬 수 있다.

또한, 각 채널에서 증폭된 유전자가 자동으로 전기영동에 연결되므로 시료의 손실과 오염을 방지할 수 있으며 전기영동에서 얻어진 밴드를 정량적으로 분석함으로써 질병에 관계한 여러 유전자의 발현을 검사할 수 있을 뿐만 아니라, 시료주입 후 증폭과 전기영동과 분석까지 연속적으로 하나의 칩상에서 수행이 가능하다.

결국, 본 발명에 따르면, 하나의 샘플을 추출하여 여러 가지 프라이머를 고정시킨 독립된 열 순환기를 이용, 동시에 여러 유전자의 발현을 검사할 수 있으며, mRNA에서 cDNA로의 역전사 및 유전자 증폭과 전기영동 및 검출이 칩 상에서 연속적으로 일어날 수 있으며, 이동(Transfer)시에 일어나는 시료의 손실 및 오염을 방지할 수 있으며, 검출 기능을 활용하여 전기영동 각 밴드의 정량적인 분석이 가능하며, 칩 상에서 멀티채널(multichannel) RT-PCR과 전기영동을 이용하여 질병과 관련된 여러 유전자들의 발현을 정량적으로 동시에 검사할 수 있는 효과가 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

- ① 샘플 주입부;
- ② 복수의 마이크로채널을 갖는 멀티채널 PCR 수행부;
- ③ 복수의 마이크로채널을 갖는 멀티채널 전기영동 수행부를 하나의 물체에 유동적으로 연결하여(in fluid communication) 포함하며.

상기 멀티채널 PCR 수행부는 각 마이크로채널마다 서로 다른 프라이머를 내포하고 독립적으로 온도 조절이 가능한 것을 특징으로 하는 소형 유전자 분석 장치.

청구항 2

제 1항에 있어서, 샘플 주입부와 멀티채널 PCR 수행부 사이에 PCR 수행을 위한 전처리 수행부를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 소형 유전자 분석 장치.

청구항 3

제 2항에 있어서, 전처리 수행부는 RT-PCR을 수행하기 위한 역전사(reverse transcription) 수행부인 것을 특징으로 소형 유전자 분석 장치.

청구항 4

제 1항에 있어서, 멀티채널 전기영동 수행부에서 실시되는 전기영동은 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)인 것을 특징으로 소형 유전자 분석 장치.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항에 있어서, 전기영동 수행부에서 분리된 밴드를 확인하기 위한 밴드 분석장치를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 소형 유전자 분석 장치.

청구항 6

- ① 칩에 샘플 주입구 및 멀티채널을 만드는 단계;
- ② 멀티채널 내에 열 순환기(thermal cycler)를 장착하여 PCR 수행부를 만드는 단계; 및
- ③ 멀티채널 내에 매트릭스를 채워 넣고 양 말단에 전극을 연결하여 전기영동 수행부를 만드는 단계를 포함하는 제 1항 내지 제 4항의 소형 유전자 분석장치의 제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 광석판인쇄술(photolithography)을 이용하여 실리콘 웨이퍼에 식각(etching)으로 멀티채널을 만드는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, PCR 수행부에 장착된 열순환기는 히터와 펠티어 소자를 함께 사용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, 전기영동 수행부내의 매트릭스는 겔(gel)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

- ① 핵산(nucleic acid)이 포함된 샘플을 특정의 프라이머가 고정된 멀티채널 PCR 수행부로 유입시키는 단계;
- ② 유입된 핵산을 멀티채널 PCR 수행부에서 유전자 증폭시키는 단계;
- ③ 증폭된 유전자를 멀티채널 전기영동 수행부로 이동시키는 단계;
- ④ 이동된 유전자를 멀티채널 전기영동 수행부에서 분리시키는 단계;
- ⑤ 분리된 유전자를 분석하는 단계를 포함하며,

하나의 칩 상에서 핵산의 증폭, 전기영동 및 분석이 연속적으로 수행되는 것을 특징으로 하는 유전자 분석 방법.

청구항 11

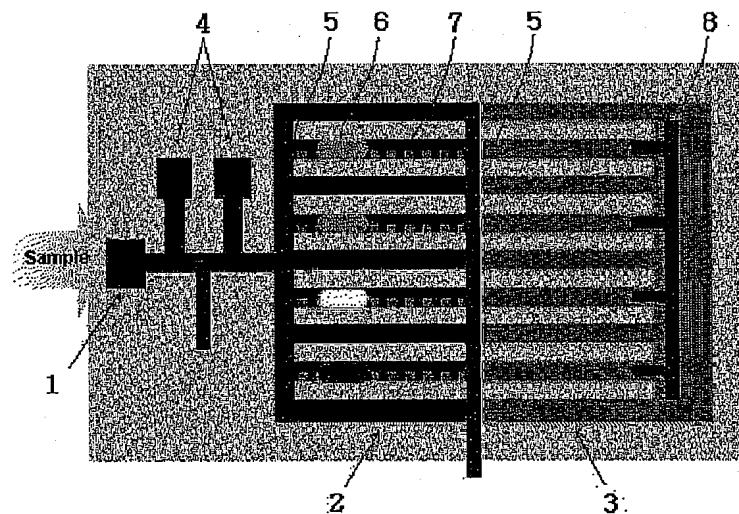
제 10항에 있어서, 멀티채널 PCR 수행부에서 복수의 유전자가 동시에 증폭되고, 증폭된 복수의 유전자가 마이크로 채널을 따라 멀티채널 전기영동 수행부로 이동되어 동시에 전기영동 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

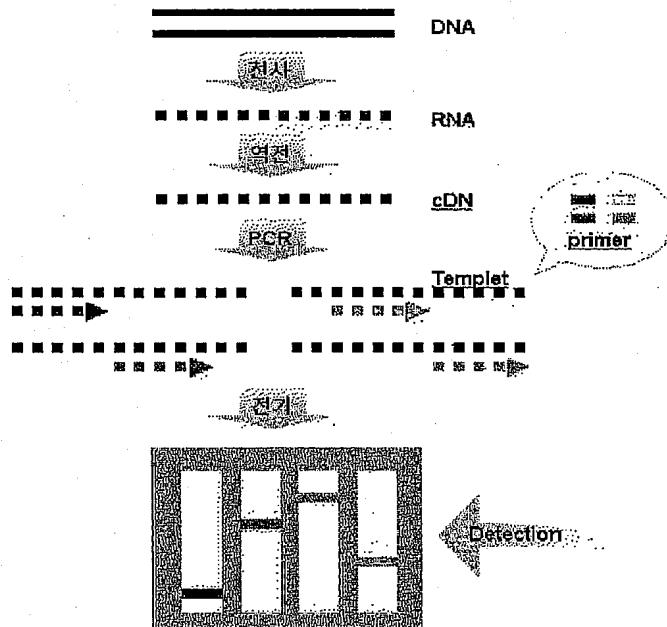
제 10항에 있어서, 유전자 질병을 진단하는 데 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

도면1



도면2



도면3

